

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10105

研究課題名(和文) 第三象牙質誘導効果を具備した齲蝕治療法の確立：過酸化水素光分解殺菌法の応用

研究課題名(英文) Development of a novel dental caries therapy based on hydrogen peroxide photolysis

研究代表者

中村 圭祐 (Nakamura, Keisuke)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：30431589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、過酸化水素光分解殺菌法を齲蝕治療の分野で応用するための基礎的検討を行った。過酸化水素光分解殺菌法とは、口腔内消毒薬としても用いられている3%過酸化水素に光を照射して分解することで生成される水酸化ラジカルを応用した殺菌法である。まず、齲蝕原因菌を含む多菌種のバイオフィームに対する殺菌効果の検証を行い、高い殺菌効果が得られることを実証した。次にラットの上顎第一大臼歯に対して過酸化水素光分解殺菌法を行った際の歯髄反応を分析した。その結果、髄角部に限局した可逆的な変性が認められること、歯髄組織中の炎症反応は限定的であること、処理21日後までに第三象牙質が形成されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究グループでは、過酸化水素光分解殺菌法の歯科臨床応用を目指した研究を進めている。これまでに、本殺菌法を応用した歯周病治療器を開発し、治験を通して有効性を実証してきた。本研究ではこの殺菌法を齲蝕治療にも応用するために、有効性および安全性の検証を目的とした基礎的研究を実施した。その結果、齲蝕原因菌を含むバイオフィームに対しても高い殺菌効果を示すことが分かった。さらに、本殺菌法でラットの歯を処理しても歯髄の炎症を惹起しないことを確認した。さらに、歯髄で硬組織が形成されることが分かった。この作用を、歯髄を保護するために利用できれば、新しい齲蝕治療法として発展させることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to evaluate 1) the antimicrobial activity of hydrogen photolysis treatment against multi-species biofilm containing cariogenic bacteria, and 2) reactions of the dental pulp to the treatment. The hydrogen photolysis treatment is a novel antimicrobial technique in which oxidative power of hydroxyl radicals generated by photo-irradiation of hydrogen peroxide is used. The treatment could effectively reduce viable bacteria in the multi-species biofilm as in the case of single-species biofilm. The reactions of the dental pulp were evaluated in an animal study using rats. The treatment generated localized degenerative tissue at pulp horn region, whereas infiltration of inflammatory cells was not observed. The degenerative tissue was repaired within 5 days, and tertiary dentin formation was observed 21 days after treatment.

研究分野：歯科医用工学

キーワード：過酸化水素 紫外線 バイオフィーム 動物実験 第三象牙質

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における若年者の齲蝕罹患率は減少の一途をたどっているが、高齢者における齲蝕の罹患率は増加している(平成28年歯科疾患実態調査)。これは、歯科治療全般の改善によって高齢者の残存歯数が増加していること、また高齢者では歯肉退縮により歯冠部のエナメル質よりも耐酸性に劣る根面(象牙質)が露出していることが原因と考えられる。根面齲蝕は、罹患部位が解剖学的に歯髄に近接しているため、侵襲性の高い抜髄などの歯科治療が必要となる場合が多い。今後、世界的にも超高齢社会を迎えるにあたり、健康長寿を達成するためには高齢者における低侵襲かつ効果的な齲蝕の治療法の確立が必要である。

そこで、我々の研究室では過酸化水素光分解殺菌法を齲蝕治療へ応用することを検討してきた。3%過酸化水素(口腔内消毒薬として使用可能な濃度)に光を照射すると、光分解反応を介して水酸化ラジカルが生成する。水酸化ラジカルは酸化力が強く、齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* のバイオフィルムに対して強い殺菌作用を示す<sup>1)</sup>。波長365 nmの紫外線を光源として用いた場合には、15秒間の処理で99.99%の生菌数の減少をもたらすため、過酸化水素光分解殺菌法は、クロルヘキシジンなどの口腔内で使用されている消毒薬や光線力学殺菌療法よりも有意に効果的である<sup>2)</sup>。一方、過酸化水素光分解殺菌法による短時間(7分)処理は、口腔粘膜に対する刺激性がないことも実証した<sup>3)</sup>。さらに、過酸化水素光分解殺菌法をラットの大白歯に適応した場合、殺菌効果に加えて、第三象牙質の形成が誘導されることを発見した。処理後24時間では炎症性細胞の浸潤や象牙芽細胞の変性が認められないことから、紫外線照射による弱い刺激によって第三象牙質が形成されたものと考えられる。歯の切削などを伴わずに非侵襲的に第三象牙質を形成することができれば、齲蝕治療において生活歯髄をさらなる外来刺激から保護することにつながる。従って、過酸化水素光分解殺菌法は殺菌効果に加えて歯髄保護効果を具備した新しい齲蝕治療法として応用できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)齲蝕原因菌(*S. mutans*)を含む多菌種複合バイオフィルムモデルを用いて、過酸化水素の光分解反応によって生成する水酸化ラジカルの殺菌効果を評価し、齲蝕治療に最適な処理条件を探索すること、(2)ラットを用いた動物実験において第三象牙質形成効果の評価を行い、本殺菌法を応用した齲蝕治療法を病理組織学的観点から検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多菌種バイオフィルムモデルを用いた殺菌試験

実験には、*S. mutans* (JCM5705)、*S. salivarius* (JCM5707)、*S. sanguinis* (JCM5708)、*Lactobacillus casei* (JCM1134)の4菌種を用いた。各細菌が $1 \times 10^7$  CFU/mLになるように濁度を調整し、BHI液体培地に懸濁した。48ウェルプレートに細菌懸濁液を入れ、その中にハイドロキシアパタイト(HA)ディスクを浸漬して37℃で72時間嫌気培養を行った。培養後、HAディスク上に形成されたバイオフィルムを殺菌試験の対象とした。殺菌試験では、3%過酸化水素に浸漬したバイオフィルム試料に波長365 nmの紫外線A波(UVA)を放射照度1000 mW/cm<sup>2</sup>で90秒照射した。UVA照射にはUV-LED照射装置(OmniCure LX505)を用いた。処理後、BHI寒天培地(総菌数評価)、MSMUTV寒天培地(*S. mutans*選択培地)、Rogosa寒天培地(Lactobacilli選択培地)を用いて生菌数を評価した。

#### (2) ラットの大白歯における第三象牙質形成評価試験

本動物実験は、東北大学動物実験専門委員会での審査を受け、承認を得てから実施した(承認番号:2018DnA-042)。雄性Wistarラット(7週齢)の上顎第一大臼歯を試験対象部位とした。表1に示すように対象歯を6群に分けて、各群異なるUVA放射照度、薬液、処理回数を設定して実験を行った。また、コントロール群は無処理とした。メドミジン/ミダゾラム/酒石酸ブトルファール混合液の皮下注射により全身麻酔を行い、ラット用開口器をセットした。薬液(過酸化水素あるいは水)が対象歯咬合面に留まるようにテンポラリーシーリング材で対象歯を取り囲んでから薬液を適用し、UV-LED照射装置(LX505)を用いてUVA照射を行った。G1~G4では、1回/日の処理を3日連続で繰り返して行った。

処理の1日後(G1とCのみ)3日後(G1~G4の最終処理の1日後)21日後に動物を安楽死させて上顎を採取した。組織を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて固定した後、EDTA溶液(Osteosoft, Merk)に浸漬して脱灰した。処理後21日に

表1. 各試験群における処理条件

	略語	放射照度 (mW/cm <sup>2</sup> )	薬液	処理時間 (秒)	処理回数
Group 1	G1	2000	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90	3
Group 2	G2	2000	PW	90	3
Group 3	G3	1000	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90	3
Group 4	G4	500	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90	3
Group 5	G5	2000	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90	1
Control	C	-	-	-	-

採取した上顎の対象歯では、脱灰処理前に歯髄腔の体積評価のためにマイクロ CT (ScanX-mate-E090, Comscantecno) を用いた分析を行った。マイクロ CT 画像は解像度 (voxel size) が 11  $\mu\text{m}$  となるように撮影し、画像解析ソフト ImageJ を用いて歯髄腔体積の定量分析を行った。マイクロ CT 画像取得後、他の試料と同様に EDTA 溶液を用いて脱灰した。脱灰後、通法に従って脱水およびパラフィン包埋を行い、対象歯の頬舌中央部で近遠心方向の連続切片を作製した。組織標本のマトキシリン・エオジン染色および免疫染色を行い、病理組織学的分析を行った。免疫染色では、抗 heat shock protein-25 (HSP-25: 象牙芽細胞マーカー、Enzo Life Sciences) 抗体を用い、avidin-biotinylated peroxidase complex 法 (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Laboratories) と DAB 基質 (ImmPACT DAB, Vector Laboratories) により抗原を可視化した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 多菌種バイオフィームモデルを用いた殺菌試験

選択培地を用いた生菌数の評価により、本試験に用いたバイオフィームは、*S. mutans* が 90% 以上の割合を占めており、*L. casei* は総菌数の 10% 未満であることが分かった (図 1 の  $\text{H}_2\text{O}_2[-]$ UVA[-]の結果を参照)。この多菌種バイオフィームに対して、90 秒間の過酸化水素光分解殺菌処理を行うことで、3-log 程度の総菌数の減少が認められた (図 1 の  $\text{H}_2\text{O}_2[+]$ UVA[+]の結果を参照)。一方、過酸化水素単独処理あるいは UVA 照射単独によるバイオフィーム殺菌効果はほとんど認められなかった。これらの試験結果により、90 秒の過酸化水素光分解殺菌処理は、これまでの研究で用いてきた *S. mutans* の単一菌種バイオフィームのみならず、多菌種バイオフィームに対しても高い殺菌効果を発揮することが実証された。

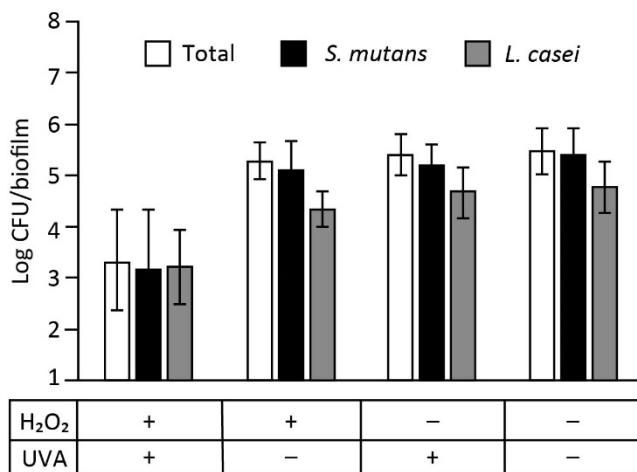


図 1. 多菌種バイオフィームの殺菌試験結果

##### (2) ラットの大白歯における第三象牙質形成評価試験

処理後 1 日、3 日、21 日の歯髄組織の代表画像を図 2、3、4 に示す。

処理後 1 日 (図 2) では、コントロール群において象牙質-歯髄境界部で HSP-25 の免疫活性を示す細胞が認められた。これらは先行研究で示されている通り象牙芽細胞であると考えられる。過酸化水素光分解殺菌処理を行った G5 では、髄角部において、HSP-25 に対する免疫活性の消失が認められ、UVA を用いた過酸化水素光分解殺菌処理が象牙芽細胞の活性に影響を及ぼすことが示唆された。一方、好中球などの炎症性細胞の浸潤は C でも G5 でもほとんど認められなかった。

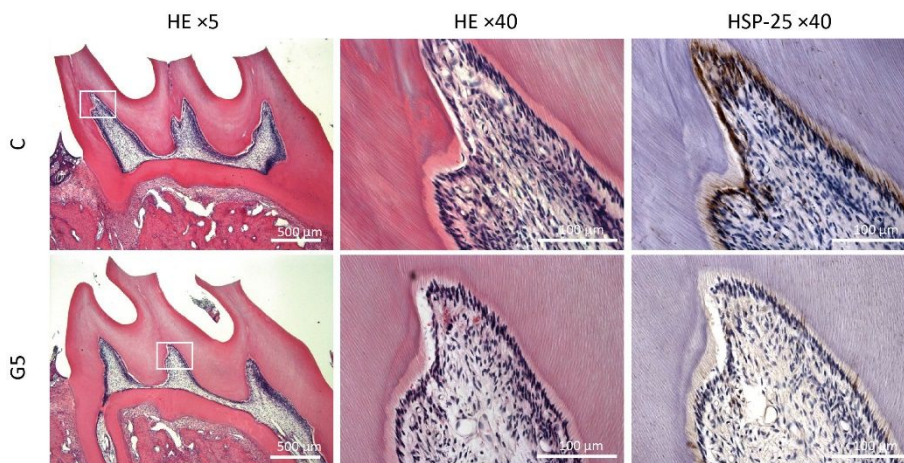


図 2. 処理後 1 日の歯髄の組織像

処理後 3 日 (図 3) では、G1 と G2 において髄角部で歯髄組織の中の細胞密度低下及び象牙芽細胞層の消失を伴う限局的な変性が髄角部で認められた。G3 と G4 では明瞭な変性は認められなかったが、象牙芽細胞の配列の乱れや、HSP-25 に対する免疫活性の消失した細胞が部分的



に認められた。G5 では、HSP-25 に対する免疫活性を有する比較的大きな細胞が象牙質-歯髓境界部で認められ、歯髓細胞の象牙芽細胞様細胞への分化が示唆された。また、各群の髓角部における炎症性細胞数をカウントしたところ、C では平均 5 細胞 / 髓角部であったのに対して、G1 では平均 13 細胞 / 髓角部となり、絶対数としては少ないが有意な増加が認められた。G2 ~ G5 では、炎症性細胞の優位な増加は認められなかった。

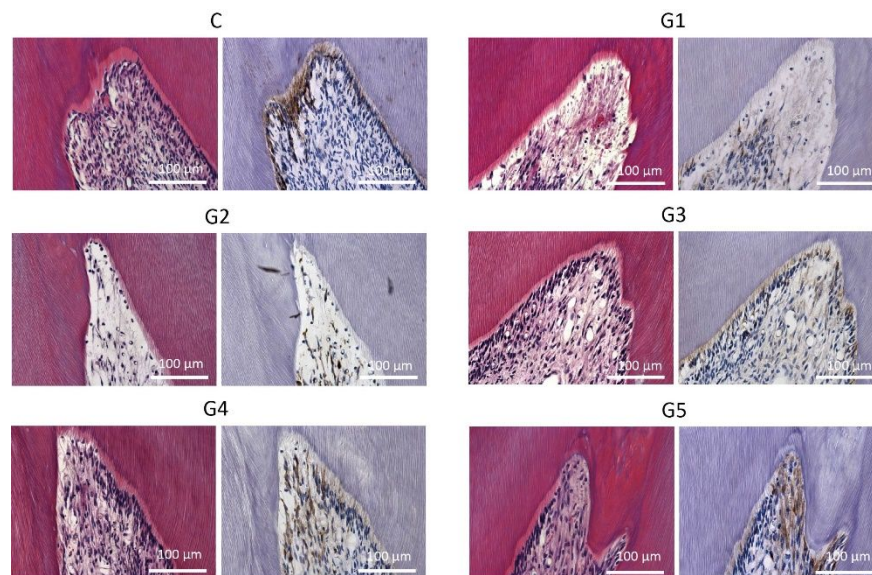


図 3. 処理後 3 日の歯髓の組織像

処理後 21 日 (図 4) では、G1 ~ G5 で HSP-25 に対する免疫活性を有する細胞が象牙質-歯髓境界部で再配列している様子が認められた。また、髓角部において第三象牙質の形成が認められた。この第三象牙質では、不規則な象牙芽細管や細胞の残存が認められた。第三象牙質の形成に伴い歯髓腔の狭窄も認められた。

マイクロ CT 分析による 3 次元的评价においても、C に比べて G1 ~ G5 で歯冠部歯髓腔の体積の減少が認められた (図 5)。つまり、組織像でも認められたように第三象牙質形成により歯髓腔が狭窄したと考えられる。G1 では最も歯冠部歯髓腔が小さくなり、G4 および G5 は、試験群の中で最も大きな歯髓腔体積を示した。従って、過酸化水素光分解処理における UVA の照射強度や処理回数が第三象牙質形成に影響を与えることが示唆された。また、G1 と G2 を比較すると、G1 の方が、歯髓腔体積が小さくなっていたため、UVA 照射のみならず過酸化水素の有無も第三象牙質形成に影響を及ぼした可能性が考えられる。ラットの上顎第一大臼歯の咬頭頂はエナメル質に覆われていないため (図 5 のマイクロ CT 画像参照)、過酸化水素が象牙細管に浸潤して象牙質-歯髓境界部まで到達した可能性が考えられる。しかしながら、ラット歯髓腔の大きさは個体差が大きく、G1 と G2 の差が統計学的に有意な差であるかどうかの結論には至らなかったため、今後より詳細な評価を行う予定である。

本動物実験を通して、UVA を用いた過酸化水素光分解殺菌法でラットの上顎第一大臼歯を処理した場合には、一時的に髓角部に限局的かつ可逆的な変性が認められること、歯髓組織中の炎症反応は限定的であること、処理 21 日後までに第三象牙質が形成されることが分かった。歯の切削などを伴わず、UVA 照射によって象牙質-歯髓境界部に硬組織を形成できる低侵襲な方法が確立されれば、深在性齲蝕などの治療において生活歯髓を保護するための新しい治療法となりえると考えられる。今後の研究で UVA 照射による第三象牙質形成が臨床的な利点を有しているかどうかを評価する必要がある。この UVA 照射による第三象牙質形成作用が臨床的に望ましくないと判断された場合には、放射照度を下げる、照射時間を短くする、

UVA の代わりに波長 400 nm 程度の青色可視光 (光子エネルギー: 可視光 < UVA) を用いるなどといった対策を講じる必要がある。

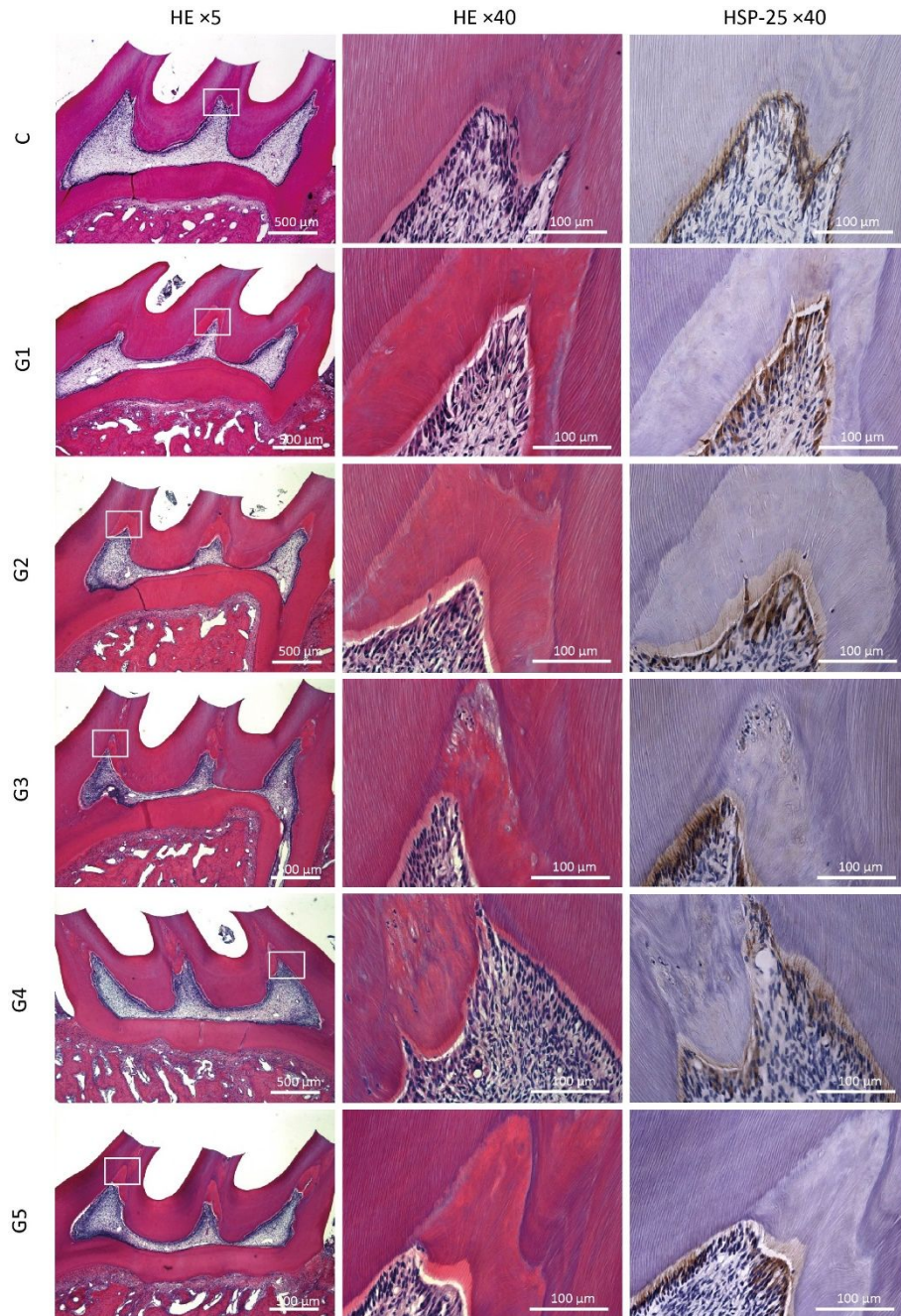


図4. 処理後21日の歯髄の組織像

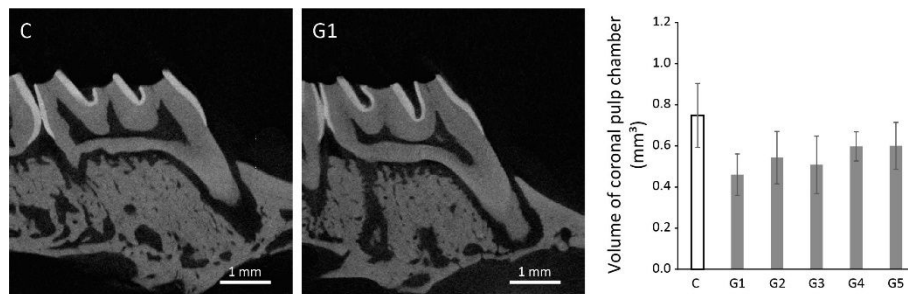


図5. 処理後21日に撮影したマイクロCTの代表画像と歯髄腔体積の定量分析結果

引用文献

- 1) Nakamura K, Shirato M, Kanno T et al. *Int J Antimicrob Agents*. 48:373-380, 2016
- 2) Shirato M, Nakamura K, Kanno T et al. *J Photochem Photobiol B*. 173:434-440, 2017
- 3) Niwano Y, Konno K, Matayoshi T et al. *Regul Toxicol Pharmacol*. 90:206-213, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura K, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Lingstrom P, Ortengren U	4. 巻 212
2. 論文標題 Reactions of dental pulp to hydrogen peroxide photolysis-based antimicrobial chemotherapy under ultraviolet-A irradiation in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Photochem Photobiol B	6. 最初と最後の頁 112042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2020.112042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura K
2. 発表標題 Applications of a novel antimicrobial chemotherapy utilizing HO generated by H2O2 photolysis to dental treatments
3. 学会等名 2020 TU-HKU-FJMU International Symposium on Oral Health Sciences (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shirato M, Nakamura K, Tenkumo T, Niwano Y, Kanno T, Sasaki K, Lingstrom P, Ortengren U
2. 発表標題 Treatment with hydrogen peroxide photolysis inhibits tooth demineralization caused by Streptococcus mutans biofilm
3. 学会等名 International Symposium for Interface Oral Health Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	天雲 太一  (Tenkumo Taichi)  (80451425)	東北大学・大学病院・講師    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スウェーデン	University of Gothenburg			